

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2003-521708
(P2003-521708A)

(43)公表日 平成15年7月15日(2003.7.15)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード*(参考)

G 0 1 N 27/416

G 0 1 N 33/483

F 2 G 0 4 5

27/327

33/66

C

33/483

33/96

33/66

27/46

3 3 6 B

33/96

3 3 6 C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-556308(P2001-556308)
 (86)(22)出願日 平成13年1月25日(2001.1.25)
 (85)翻訳文提出日 平成14年8月1日(2002.8.1)
 (86)国際出願番号 PCT/US 01/02465
 (87)国際公開番号 WO 01/057510
 (87)国際公開日 平成13年8月9日(2001.8.9)
 (31)優先権主張番号 09/497, 304
 (32)優先日 平成12年2月2日(2000.2.2)
 (33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 ライフスキャン・インコーポレイテッド
 Lifescan, Inc.
 アメリカ合衆国、95035 カリフォルニア
 州、ミルピタス、ジブラルター・ドライブ
 1000
 1000 Gibraltar Drive,
 Milpitas, California
 95035, United States
 of America

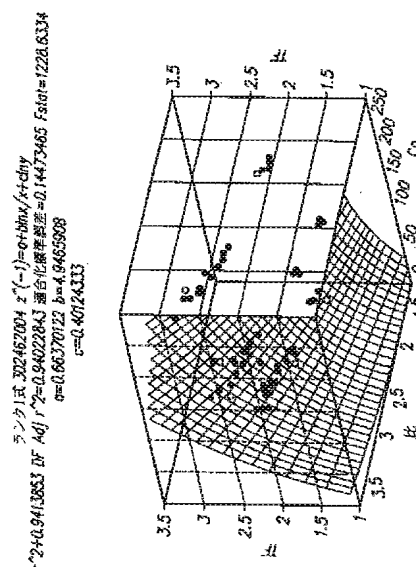
(74)代理人 弁理士 田澤 博昭 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘマトクリット値を補正した検体濃度の測定に用いる電気化学的方法および装置

(57)【要約】

生理学的サンプル中の検体の濃度を測定するための方法および装置を提供する。本発明の方法では、生理学的サンプルを作用電極および参照電極を有する電気化学セル内に導入する。第1の電位をセルに印加し、第1の期間に得られたセル電流を測定して第1の時間-電流過渡を決定する。次いで、反対の極性の第2の電位をセルに印加し、第2の時間-電流過渡を決定する。次いで、検体の予備濃度 (C_0) を第1および/または第2の時間-電流過渡から計算する。次いで、この予備検体濃度、バックグラウンド値よりも少ない、にヘマトクリット補正係数を乗じてサンプル中の検体濃度を得るが、この場合、ヘマトクリット補正係数は予備検体濃度と、電気化学セルの時間-電流過渡内の2つの電流値 (i) の比との関数である。本発明の方法および装置は種々多様なサンプル中の種々多様な検体の測定に使用するのに適しており、特に関心のある検体がグルコースである場合に、全血またはその誘導物中の検体を測定するのに特に適している。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理学的サンプル中の検体のヘマトクリット補正濃度を決定する方法であって、

(a) 前記生理学的サンプルを

(i) 離隔した作用電極および参照電極、および

(i i) 酵素とメジエーターとを含むレドックス試薬系

を含む電気化学セルに導入し、

(b) 前記反応セルに第1の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第1の時間－電流過渡を得、

(c) 前記反応セルに第2の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第2の時間－電流過渡を得、

(d) 前記第1の時間および第2の時間－電流過渡から予備検体濃度を導き、かつ

(e) バックグラウンド値よりも低い前記予備検体濃度にヘマトクリット補正係数を乗じて前記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導き、

それにより前記サンプル中の前記検体のヘマトクリット補正濃度を決定する方法。

【請求項2】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度値を調整して前記予備検体濃度値のヘマトクリットに由来する成分を除去する請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度および前記電気化学セルの y の関数である請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記生理学的サンプルが全血またはその誘導物である請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記検体がグルコースである請求項1記載の方法。

【請求項6】 全血サンプル中の検体のヘマトクリット補正濃度を決定する方法であって、

(a) 前記全血サンプルを

(i) 離隔した作用電極および参照電極、および

- (i i) 酵素とメジエーターとを含むレドックス試薬系を含む電気化学セルに導入し、
 - (b) 前記反応セルに第1の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第1の時間一電流過渡を得、
 - (c) 前記反応セルに第2の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第2の時間一電流過渡を得、
 - (d) 前記第1の時間および第2の時間一電流過渡から予備検体濃度を導き、かつ
 - (e) バックグラウンド値よりも低い前記予備検体濃度にヘマトクリット補正係数を乗じて前記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導き、
- それにより前記サンプル中の前記検体のヘマトクリット補正濃度を決定する方法。

【請求項7】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度および前記電気化学セルの y の関数である請求項6記載の方法。

【請求項8】 前記検体がグルコースである請求項6記載の方法。

【請求項9】 前記酵素が酸化酵素である請求項6記載の方法。

【請求項10】 前記酸化酵素がグルコース酸化酵素である請求項9記載の方法。

【請求項11】 全血サンプル中のグルコースのヘマトクリット補正濃度を決定する方法であって、

- (a) 前記全血サンプルを
 - (i) 離隔した作用電極および参照電極、および
 - (i i) グルコース酸化酵素とメジエーターとを含むレドックス試薬系を含む電気化学セルに導入し、
- (b) 前記反応セルに第1の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第1の時間一電流過渡を得、
- (c) 前記反応セルに第2の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第2の時間一電流過渡を得、
- (d) 前記第1の時間および第2の時間一電流過渡から予備検体濃度を導き、

かつ

(e) バックグラウンド値よりも低い前記予備グルコース濃度にヘマトクリット補正係数を乗じて前記サンプル中のヘマトクリット補正グルコース濃度を導き、

それにより前記サンプル中のグルコースのヘマトクリット補正濃度を決定する方法。

【請求項12】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度および前記電気化学セルの γ の関数である請求項11記載の方法。

【請求項13】 前記ヘマトクリット補正係数が
$$1 / \left((0.6637) + \left((4.9466 * \ln(C_0)) / C_0 \right) + \left(-0.4012 * \ln(\gamma) \right) \right)$$

(式中、 C_0 は前記予備濃度であり、かつ γ は前記電気化学セルの可変電流比である)

に等しい請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記サンプルの前記予備グルコース濃度が40mg/dLよりも高い請求項13記載の方法。

【請求項15】 前記電気化学セルの変数 γ が0.7より大きい請求項13記載の方法。

【請求項16】 生理学的サンプル中の検体の濃度を電流測定により測定するための計測装置であって、

(a) 前記サンプルを含む電気化学セルに第1の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第1の時間一電流過渡を得るための手段、

(b) 電気化学セルに第2の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第2の時間一電流過渡を得るための手段、

(c) 前記第1の時間および第2の時間一電流過渡から予備検体濃度値および変数 γ を決定する手段、および

(d) 予備濃度値からヘマトクリット成分を除去して前記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導く手段

を備える計測装置。

【請求項17】 前記ヘマトクリット成分を除去する手段が前記バックグラウンド値よりも低い予備検体濃度にヘマトクリット補正係数を乗じる手段である請求項16記載の計測装置。

【請求項18】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度および前記電気化学セルの変数 y の関数である請求項16記載の計測装置。

【請求項19】 前記ヘマトクリット補正係数が

$$1 / \left((0.6637) + \left((4.9466 * \ln(C_0)) / C_0 \right) + (-0.4012 * \ln(y)) \right)$$

(式中、 C_0 は前記予備濃度であり、かつ y は前記電気化学セルの可変電流比である)

に等しい請求項18記載の計測装置。

【請求項20】 前記検体がグルコースである請求項16記載の計測装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

序

技術分野

本発明の分野は検体測定、特に電気化学検体測定、さらに詳しくは血液検体の電気化学的測定に関する。

【0002】

背景技術

生理学的液体、例えば血液または血液由来製品中の検体測定は今日の社会においてはますます重要となっている。検体測定アッセイは臨床検査室試験、家庭試験等を始めとする広範な応用に用途を有し、それらの試験の結果、種々の疾病状態の診断および管理に卓越した役割を果たしている。関心がもたれている検体としては糖尿病管理用のグルコース、コレステロール等がある。この重要性がますます増大している検体検出に応じて、臨床用および家庭用の両方に対して種々の検体検出プロトコルおよび装置が開発されている。

【0003】

検体検出に用いられる方法のタイプの一つは電気化学方法である。そのような方法では、2つの電極、すなわち参照電極と作用電極を備え、それらの電極が電流測定装置として適したインピーダンスを有する電気化学セル内の反応ゾーンに水性液体サンプルを置く。分析すべき成分を直接電極と反応させるか、レドックス試薬と直接または間接的に反応させて酸化可能な（または還元可能な）物質、すなわち検体、を分析すべき成分の濃度に相当する量で形成する。次いで、酸化可能な（または還元可能な）物質の存在量を電気化学的に概算し、最初のサンプル中に存在する検体の量と関係付ける。

【0004】

検定する生理学的サンプルが全血またはその誘導物である場合、サンプルのヘマトクリットが最終的検体濃度測定における分析誤差源となり得る。例えば、検体濃度が観測された時間一電流過渡状態から導かれる電気化学的測定プロトコルでは、ヘマトクリットが電気化学セル内の平衡反応を遅くする、および／または

セル内のサンプルの粘度を増加することにより酵素の反応速度を遅くすることにより、時間一電流応答を減衰し、分析誤差を生じることがあり得る。

【0005】

従って、ヘマトクリットに由来する分析誤差を少なくとも最小限にする方法の開発に大きな関心が寄せられている。あるプロトコルでは、血液濾過膜を用いて赤血球を除去することによりヘマトクリット効果を最小限にしている。これらの特定のプロトコルはサンプルの体積が増加しているとともに試験時間を要する点で不満足である。他のプロトコルは毛管充填時間の測定に関心を集中している。しかしながらこれらのプロトコルはストリップとそれらを読み取るのに使用される装置を複雑なものにしている。さらに別の具体策では、2つの追加の電極を使用してヘマトクリットを別個に測定しているが、これもストリップ／装置をさらに複雑かつ高価なものにする結果となっている。

従って、サンプルのヘマトクリットに由来する分析誤差を最小限にする、生理学的サンプル中の検体の濃度を電気化学的に測定する新規な方法を突き止めることに引き続き関心がもたれている。

【0006】

関連文献

関心がもたれる文献としては米国特許第5,942,102号およびWO 97/18465号公報が挙げられる。

【0007】

発明の開示

生理学的サンプル中の検体の濃度を測定するための方法および装置を提供する。本発明の方法では、生理学的サンプルを作用電極および参照電極を有する電気化学セル内に導入する。第1の電位をセルに印加し、第1の期間に得られたセル電流を測定して第1の時間一電流過渡を決定する。次いで、反対の極性の第2の電位をセルに印加し、第2の時間一電流過渡を決定する。次いで、検体の予備濃度(C₀)を第1および／または第2の時間一電流過渡から計算する。次いで、バックグラウンド値よりも少ない、この予備検体濃度に、ヘマトクリット補正係数を乗じてサンプル中の検体濃度を得るが、この場合、ヘマトクリット補正係数

は予備検体濃度と、電気化学セルの時間－電流過渡内の2つの電流値 (γ) の比との関数である。本発明の方法および装置は種々多様なサンプル中の種々多様な検体の測定に使用するのに適しており、特に関心のある検体がグルコースである場合に、全血またはその誘導物中の検体を測定するのに特に適している。

【0008】

発明を実施するための最良の形態

生理学的サンプル中の検体の濃度を測定するための方法および装置を提供する。本発明の方法では、生理学的サンプルを作用電極および参照電極を有する電気化学セル内に導入する。第1の電位をセルに印加し、第1の期間に得られたセル電流を測定して第1の時間－電流過渡を決定する。次いで、反対の極性の第2の電位をセルに印加し、第2の時間－電流過渡を決定する。次いで、検体の予備濃度 (C_0) を第1および／または第2の時間－電流過渡から計算する。次いで、バックグラウンド値よりも少ない、この予備検体濃度に、ヘマトクリット補正係数を乗じてサンプル中の検体濃度を得るが、この場合、ヘマトクリット補正係数は予備検体濃度と、電気化学セルの変数 γ の比との関数である。本発明の方法および装置は種々多様なサンプル中の種々多様な検体の測定に使用するのに適しており、特に関心のある検体がグルコースである場合に、全血またはその誘導物中の検体を測定するのに特に適している。さらに、本発明を説明する際に、本発明の方法を最初に説明し、次いで本発明の方法を実施するのに用いる代表的な装置を概観する。

【0009】

本発明をさらに説明する前に、了解されるべきことは、特定の実施態様を種々に変更することができ、それらの変更が依然として添付の請求の範囲内に入るので、本発明は下記の本発明の特定の実施態様に限定されず、本発明の範囲は添付の請求項によって定まることである。また、了解されるべきことは、用語使用法は特定の実施態様を説明するためのものであり、限定的なものではないことである。むしろ、本発明の範囲は特許請求の範囲によって決まる。

【0010】

本明細書および添付の請求項において、特に明示しない限り、単数に言及した

場合は複数の場合をも含む。特に記さない限り、ここで用いる技術および科学用語はすべて本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者に普通に理解されるものと同じ意味を有する。

【0011】

方法

以上要約したように、本発明は生理学的サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度値を決定するための方法を提供する。「ヘマトクリット補正検体濃度」という用語は本発明の方法を用いて決定した検体濃度値を調整し、変化させて、同値に対するヘマトクリットの寄与が実質的にすべて除去してあることを意味する。換言すれば本発明の方法を用いて決定された濃度値を修飾して、同値中に存在することが考えられるサンプルのヘマトクリットからの寄与分を、本発明の実施による分を除いて、除去してあるということである。従って、本発明の方法ではヘマトクリット・シグナルを検体シグナルから解き放し、検体シグナルのみを用いて最終的なヘマトクリット補正検体濃度に到達する。

【0012】

本発明の第1の工程は、ある量の関心のある生理学的サンプルを、離隔した作用電極と参照電極およびレドックス試薬系を備える電気セル内に導入することである。この生理学的サンプルは変えられるが、多くの実施態様では、一般に全血またはその画分であり、多くの実施態様では全血に特に関心がもたれる。試験ストリップの反応領域に導入される生理学的サンプル、例えば血液、の量は変えられるが、一般に約0.1 μ L乃至10 μ L、通常約0.9 μ L乃至1.6 μ Lである。このサンプルは適宜サンプルを反応領域に注入し、反応領域に吸い上げさせる等、任意の適当なプロトコルを用いて反応領域に導入することができる。

【0013】

本発明の方法は原理的に離隔した作用電極と参照電極およびレドックス試薬系を備える任意のタイプの電気セルを用いて使用することができるが、多くの実施態様では本発明の方法は電気化学的試験ストリップを使用する。本発明のこれらの実施態様で用いられる電気化学的試験ストリップは、薄いスペーサー層により分離された2つの対向する金属電極から構成され、これらの部品は反応領域また

はゾーンを画成し、その中にレドックス試薬系を配置する。

【0014】

これらの電気化学的試験ストリップのある実施態様では、作用電極と参照電極は一般に細長い矩形上のストリップの形に構成される。典型的には、これら電極の長さは約1.9 cm乃至4.5 cm、通常約2 cm乃至2.8 cmである。これら電極の幅は約0.38 cm乃至0.76 cm、通常約0.51 cm乃至0.67 cmである。参照電極の厚さは典型的には約10 nm乃至100 nmであり、通常約10 nm乃至20 nmである。ある実施態様では、一方の電極の長さは他方の電極の長さよりも短く、ある実施態様では約0.32 cm短い。短い方の電極は作用電極または参照電極のいずれであってもよい。

【0015】

作用電極と参照電極は、これら電極の少なくともストリップの反応領域に面する面が金属であることをさらに特徴としており、関心のある金属としてはパラジウム、金、白金、銀、イリジウム、炭素、ドーパされた酸化インジウム錫、ステンレス鋼等が挙げられる。多くの実施態様において、金属は金またはパラジウムである。原則として、電極全体を金属で作成してもよいが、電極のそれぞれが、一般に表面に電極の金属成分の薄層が存在する不活性支持材料から構成されていてもよい。これらのより一般的な実施態様では、不活性基材の厚さは典型的には約51 μm 乃至356 μm 、通常約102 μm 乃至153 μm であるが、金属層の厚さは典型的には約10 nm乃至100 nm、通常約10 nm乃至40 nmであり、例えばスパッタリングにより形成された金属層である。これら電極においては任意の適当な不活性基材を使用することができ、この場合典型的にはこの材料は電極、ひいては電気化学的試験ストリップ全体に対して構造的サポートを与えることができる剛性材料である。基材として使用できる好適な材料としてはプラスチック類、例えばPET、PETG、ポリイミド、ポリカーボネート、ポリスチレン、シリコン、セラミック、ガラス等が挙げられる。

【0016】

本発明の方法のこれらの実施態様において用いられる電気化学的試験ストリップの一つの特長は上記作用電極および参照電極が相互に対向しわずかな距離しか

離れていないため、電気化学的試験ストリップの反応ゾーンまたは領域における作用電極と参照電極との間の距離が極端に小さいことである。この本発明の試験ストリップにおいて作用電極と参照電極が最小の間隔となっているのは作用電極と参照電極との間に薄いスペーサー層が配置または挟持されているためである。このスペーサー層の厚さは一般に約 $1\ \mu\text{m}$ 乃至 $500\ \mu\text{m}$ 、通常約 $102\ \mu\text{m}$ 乃至 $153\ \mu\text{m}$ である。このスペーサー層を切断して、少なくとも1個の反応ゾーンへの入口と、一般に1個の反応ゾーンへの出口を有する反応ゾーンまたは領域を設ける。このスペーサー層は側面に入口および出口を設けた円形反応領域を有していてもよいが、他の構造、例えば四角形、三角形、矩形、不規則な形の反応領域等も可能である。このスペーサー層は任意の適当な材料から作成することができ、代表的な好適な材料としてはPET、PETG、ポリイミド、ポリカーボネート等が挙げられ、スペーサー層の表面を処理してそれぞれの電極に対して接着性を持つようにすることにより電気化学的試験ストリップの構造を維持することもできる。特に有利なのは打ち抜き両面接着ストリップをスペーサー層として使用することである。

【0017】

本発明のこれらの実施態様において用いられる電気化学的試験ストリップは作用電極、参照電極およびスペーサー層により画成される反応ゾーンまたは領域を備え、これらの要素は上述した通りである。具体的には、作用電極と参照電極は反応領域の頂部と底部とを画成し、スペーサー層は反応領域の壁を画成する。反応領域の体積は少なくとも約 $0.1\ \mu\text{L}$ 、通常 $1\ \mu\text{L}$ 、さらには少なくとも約 $1.5\ \mu\text{L}$ であり、この体積は $10\ \mu\text{L}$ 以上もの大きさであってもよい。上述のように、反応領域は一般に少なくとも1個の入口と多くの実施態様において1個の出口を備える。これら入口および出口の断面積は反応領域からの液体の効率的な出入りに十分な大きさである限り、変えてもよいが、一般には約 $9 \times 10^{-4}\ \text{cm}^2$ 乃至約 $5 \times 10^{-3}\ \text{cm}^2$ 、通常約 $1.3 \times 10^{-3}\ \text{cm}^2$ 乃至約 $2.5 \times 10^{-3}\ \text{cm}^2$ である。

【0018】

反応領域に存在するのはレドックス試薬系であり、この試薬系は電極により検

出される化学種を準備し、従って生理学的サンプル中の検体の濃度をえるために使用される。反応領域内に存在するレドックス試薬系は典型的には少なくとも1種の酵素とメジエーターを含む。多くの実施態様では、レドックス試薬系の酵素メンバーは関心のある検体を酸化する酵素、または協働して酸化する複数の酵素である。換言すれば、レドックス試薬系の諸成分は単一の検体酸化酵素または関心のある検体を協働して酸化する2種以上の酵素の集合体から構成されている。関心のある酵素としてはオキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ、リパーゼ、キナーゼ、ジホラーゼ、キノプロテイン等が挙げられる。

【0019】

反応領域内に存在させる特定の酵素は電気化学的試験ストリップが検出するように設計された特定の検体によって決まり、代表的な酵素としてはグルコース・オキシダーゼ、グルコース・デヒドロゲナーゼ、コレステロール・エステラーゼ、コレステロール・オキシダーゼ、リポプロテイン・リパーゼ、グリセロール・キナーゼ、グリセロール-3-リン酸・オキシダーゼ、ラクテート・オキシダーゼ、ラクテート・デヒドロゲナーゼ、パイラベート・オキシダーゼ、アルコール・オキシダーゼ、ビリルビン・オキシダーゼ、ウリカーゼ等が挙げられる。関心のある検体がグルコースである多くの好適な実施態様では、レドックス試薬系の酵素成分はグルコース酸化酵素、例えばグルコース・オキシダーゼまたはグルコース・デヒドロゲナーゼである。

【0020】

レドックス試薬系の第2の成分はメジエーター成分であり、1種以上のメジエーター剤から構成されている。当技術において種々多様なメジエーター剤が知られており、フェリシアニド、フェナジン・エトスルフェート、フェナジン・メトスルフェート、フェニレンジアミン、1-メトキシフェナジン・メトスルフェート、2,6-ジメチル-1,4-ベンゾキノン、2,5-ジクロロ-1,4-ベンゾキノン、フェロセン誘導体、オスミウム・ビピリジル錯体、ルテニウム錯体等が挙げられる。グルコースが関心のある検体であり、グルコース・オキシダーゼまたはグルコース・デヒドロゲナーゼが酵素成分である実施態様では、特に関心のあるメジエーターはフェリシアニド等である。

【0021】

反応領域に存在していてもよい他の試薬としては、緩衝剤、例えばシトラコン酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、「グッド (Good)」緩衝剤等が挙げられる。存在していてもよいさらに別の試薬としては、塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムのような二価のカチオン類、ピロロキノリン・キノン、トリトン (Triton)、マコール (Macol)、テトロニック (Tetronic)、シルウェット (Silwet)、ゾニル (Zonyl) およびプルロニック (Pluronic) のような界面活性剤類、アルブミン、スクロース、トレハロース、マンニトール、およびラクトースのような安定化剤が挙げられる。

【0022】

レドックス試薬系は一般に乾燥形態である。種々の成分の量は変えられるが、酵素成分の量は典型的には約 1 mg/mL 乃至 100 mg/mL 、通常約 5 mg/mL 乃至 8 mg/mL の範囲内であり、メジエーター成分の量は典型的には約 5 mM 乃至 $1,000\text{ mM}$ 、通常約 90 mM 乃至 900 mM の範囲内である。

【0023】

サンプルの導入後、第1の時間および第2の時間—電流過渡を得る。第1の時間および第2の時間—電流過渡はセルに一定した電位を印加しセル内の時間の経過に対する電流の変化を観測することにより得られる。すなわち、セルに第1の時間および第2のパルス印加し、得られた時間—電流過渡を観測する。従って、第1の時間—電流過渡はセルに、例えば作用電極と参照電極の間に、一定した電位すなわち第1のパルス印加し、時間に対する電極間の電流の変化、すなわちセル電流の変化、を観測することにより得られる。最初に印加される電位の大きさは一般に約 0 V 乃至 -0.6 V 、通常約 -0.2 V 乃至 -0.4 V の範囲内である。電極間の電流を観測して第1の時間—電流過渡を得るための時間の長さは典型的には約3秒乃至20秒、通常約4秒乃至10秒の範囲内である。

【0024】

第2の時間—電流過渡は、典型的には上記第1の一定した電位とは反対の極性の、第2の一定した電位すなわち第2のパルス印加し、第2の時間に対する電極間の電流の変化を観測することにより得られる。この第2の一定した電

位の大きさは典型的には約0 V乃至+0.6 V、通常約+0.2 V乃至+0.4 Vの範囲内であるが、多くの実施態様では第2の電位の大きさは第1の電位の大きさと同じである。第2の時間は典型的には約1秒乃至10秒、通常約2秒乃至4秒の範囲内である。この第2の時間の間の電極間の電流の変化を観測することにより、このセルについての第2の時間—電流過渡が測定される。

【0025】

必要な第1の時間および第2の時間—電流過渡を得るのに要する全時間は上述のようにある実施態様では比較的短い。そのような実施態様では、第1の時間および第2の時間—電流過渡を得るのに必要な総時間は約30秒未満、通常約20秒未満、さらには約14秒未満である。

【0026】

本発明方法の第2の工程は上述のようにして得られた、観測された第1の時間及び第2の時間—電流過渡を用いて、(a) 本発明の方法に使用される電気化学セルの変数 γ および (b) サンプル中の関心のある検体の予備検体濃度を決定することである。

【0027】

本発明の方法において用いられる変数 γ は電気化学セルの理想からの偏差を説明するものとして定義される。背景を説明すると、 γ は理想的条件下、すなわち試薬の平衡およびグルコースの反応が第1のパルスが終わる前に完了している状態では1に近似するはずであることに注意すべきである。これらの条件のうちいずれか1つでも完全でない場合は上記の比が1からずれる。 γ の分子はセルに第2の電位を印加した後に観測される定常電流、すなわち第2の時間—電流過渡の $t \rightarrow \infty$ において予測される値として定義される。分母は第1の期間の終端近く、すなわち第1の電位、すなわち第1のパルスの印加の終点近くの短期間の間の平均電流として定義される。平均電流が決定される短期間は典型的には0.2秒乃至2秒、通常約0.2秒乃至1.5秒、さらには約0.2秒乃至1.25秒であり、多くの実施態様ではこの短期間は約0.3秒である。平均電流は第1の果敢の終端近くの時間で、典型的には約0.1秒乃至1秒以内に測定される。ある実施態様では、偏差 γ は下式により表される。

$$y = i_{ss} / i_{pp}$$

式中、 i_{ss} は第2の印加電位の定常電流、および

i_{pp} は第1の期間の終端近くすなわち、第1の電位をセルに印加する時間の終端近くの短期間の間の平均電流である。例えば、第1の時間の長さが10秒間である場合、平均電流は10秒間の期間のうち8.5秒乃至9.5秒、すなわち第1の時間期間の終端から0.5秒前の1.0秒の時間期間、の平均電流であつてもよい。上述のように、第1の時間および第2の時間—電流過渡も検定するサンプルの予備検体濃度値を導くのに用いられる。多くの実施態様では、この予備検体濃度は下記の式を用いて決定される。

$$i(t) = i_{ss} \{1 + 4 \exp(-4\pi^2 D t / L^2)\}$$

$$i_{ss} = 2 F A D C_0 / L$$

式中、 i_{ss} は第2の電位の印加後の定常電流である。

i は時間の関数である測定電流である。

D はセルの拡散定数であり、この係数は F i c k の第1法則、すなわち、 $J(x, t) = -D \frac{dc(x, t)}{dx}$ から決定することができる。

L はスペーサーの厚さである。

t は第2の電位の印加時間であり、 $t = 0$ をパルスの開始時とする。

C_0 は検体の予備濃度である。

F はファラデー定数、すなわち 9.6485×10^4 C/mol である。

A は作用電極の面積である。

【0028】

上記式および工程を用いて、観測された第1の時間および第2の時間—電流過渡を用いて本発明の方法に用いられる電気化学セルの変数 y および生理学的サンプル中の関心のある検体の予備濃度値とを決定する。

【0029】

決定された変数 y と予備検体濃度値とからヘマトクリット補正係数を決定し、このヘマトクリット補正係数を用いて上述の当初のすなわち予備検体濃度値からヘマトクリット補正検体濃度値を得る。このヘマトクリット補正係数は、上記予備検体濃度（典型的にはバックグラウンド値よりも低い）にそれに乗じてヘマト

クリット補正検体濃度値、すなわち、ヘマトクリット成分を除去した濃度値を得るための係数である。このヘマトクリット補正係数は予備検体濃度値と電気化学セルの変数 y の両方の関数である。

【0030】

予備濃度値（以下に詳細に説明するように、通常バックグラウンド値よりもひくい）を掛け算することができる任意のヘマトクリット補正值を本発明の方法に用いてもよい。本発明の方法に使用できる一群のヘマトクリット補正係数は広範な検体とヘマトクリット値とを用いた実験データから得られた C_0 、 y および α (C_0 , y) の3次元グラフから導かれるものである。ヘマトクリット補正係数 (α (C_0 , y)) 次式：

$$\alpha(C_0, y) = \text{実際の濃度} / (C_0 - \text{バックグラウンド値})$$

（例えば、検体がグルコースの場合、多くの実施態様で α (C_0 , y) は、イエロー・スプリングス・インスツルメント社 (Yellow Springs Instrument) のグルコース分析器モデル23A（米国特許第5,968,760号公報に記載、この内容は参考のために本明細書において引用される）を用いて測定された濃度をバックグラウンド値より低い、例えば22mg/dLの C_0 で除したものに等しい）。このヘマトクリット補正係数の群は典型的には予測データと実際のデータとの間の誤差を最小限にする平滑面関数に適合する式である。例えば下記の実験例の項を参照されたい。本発明の方法に使用できるヘマトクリット補正係数の代表的な例の一つは次のものである。

$$1 / ((0.6637) + ((4.9466 * \ln(C_0)) / C_0) + (-0.4012 * \ln(y)))$$

【0031】

本発明による検体のヘマトクリット補正濃度を決定するには、上述のようにして決定した、バックグラウンド・シグナル値よりも低い、予備検体濃度 (C_0) にヘマトクリット補正係数を掛け算する。予備濃度値から引き算されるバックグラウンド値は測定する検体によって決まる。グルコースについては、この値は典型的には約0mg/dL乃至40mg/dL、通常約8mg/dL乃至25mg/dLの範囲内であり、多くの実施態様ではこのバックグラウンド値は約22m

g/dLであるかまたは22mg/dLである。

【0032】

一般に、下記の式を用いて本発明によるヘマトクリット検体濃度を決定する。

ヘマトクリット補正濃度＝ヘマトクリット補正係数× $[C_0 - \beta]$

式中、 β はバックグラウンド値であり、

C_0 は予備検体濃度である。

【0033】

上記方法によりヘマトクリット補正検体濃度、すなわちヘマトクリット成分を解き放し、除去した濃度値が得られる。従って、上記方法は検定するサンプル中の検体濃度の精確な値を提供する。

本発明の方法の上記計算工程は手動または自動化された計算手段を用いて行うことができるが、多くの実施態様では、下記の本発明の装置と一緒に説明されているような自動化された計算手段を使用することに関心がある。

【0034】

装置

本発明はまた本発明を実施するのに使用する計測装置を提供する。本発明の計測装置は典型定期には生理学的サンプル中の検体のヘマトクリット補正濃度を電流測定するための計測装置である。本発明の計測装置は、典型的には、(a) サンプルを導入した電気化学セルに第1の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第1の時間－電流過渡を得るための手段、(b) 電気化学セルに第2の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第2の時間－電流過渡を得るための手段、(c) 上記第1の時間および第2の時間－電流過渡から予備検体濃度および変数 y を決定する手段、および(d) 予備濃度値からヘマトクリット成分を除去して上記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導く手段を備える。手段(a)および手段(b)は任意の適当な手段であってよいが、代表的手段がWO 97/18465号および米国特許第5,942,102号に記載されており、これらの公報明細書の記載内容は参考のために本明細書において引用される。手段(c)および手段(d)は典型的には測定された第1の時間および第2の時間－電流過渡を用いて最終的にヘマトクリット補正検体濃度を得る

ことが可能な計測装置内に存在する計算手段である。従って、手段(c)は典型的には、上記の式を用いて第1の時間および第2の時間—電流過渡から関心のあ
る検体の予備濃度と変数 y とを決定することが可能な手段である。同様に、手段
(d)は典型的には上記の式を用いてヘマトクリット補正濃度を決定することが
可能な手段であり、この手段は典型的にはヘマトクリット補正係数を含む。

【0035】

実施例

以下の実施例は説明のために提供されるものであり、限定のためではない。

実験例

I. 電気化学的試験ストリップの調製

サンドイッチ構造に配向された2つの金属化電極からなる電気化学的試験スト
リップを下記の通り調製した。この試験ストリップの最上層は金をスパッタリン
グにより適用したマイラー(Mylar)ストリップである。中間層は反応ゾーンま
たは領域を画成するパンチ穴を有する両面接着材である。このパンチ穴は隣接す
る矩形状の入口チャンネルおよび出口チャンネルを有する円形構造である。この試験
ストリップの最下層はマイラーにパラジウムをスパッタリングにより適用したも
のである。フェリシアナイドとグルコース・デヒドロゲナーゼPQQの膜を、パ
ラジウムをスパッタリングした表面に堆積した。

【0036】

II. 実験データの生成

第1の時間および第2の時間—電流過渡を多数の種々のサンプルについてグル
コース濃度とヘマトクリットを変えて下記のようにして得た。サンプルをストリ
ップに適用し、 -0.03 V の印加電位を10秒間の期間作用させ、引き続き $+0.3\text{ V}$ の第2のパルスを3秒乃至10秒間の期間作用させた(この場合、これ
らの電位は金電極に対するものである)。

【0037】

III. グルコースに対するヘマトクリット補正係数の導出

上述のようにして測定した広範なグルコース値およびヘマトクリット値につい
て、 C_0 、変数 y および $\alpha(C_0, y)$ を導いた。

C_0 は次式を用いて導いた。

$$i(t) = i_{ss} \{1 + 4 \exp(-4\pi^2 D t / L^2)\}$$

$$i_{ss} = 2 F A D C_0 / L$$

式中、 i_{ss} は第2の電位の印加後の定常電流である。

i は時間の関数である測定電流である。

D はセルの拡散定数であり、この係数は F i c k の第1法則、すなわち、 $J(x, t) = -D \frac{dC(x, t)}{dx}$ から決定することができる。

L はスペーサーの厚さである。

t は第2の電位の印加時間であり、 $t = 0$ をパルスの開始時とする。

C_0 は検体の予備濃度である。

F はファラデー定数、すなわち 9.6485×10^4 C/mol である。

A は作用電極の面積である。

【0038】

変数 γ は次式を用いて導いた。

$$\gamma = i_{ss} / i_{pp}$$

式中、 i_{ss} は第2の印加電位の定常電流、および

i_{pp} は第1のパルスを印加する10秒の期間のうち8.5秒乃至9.5秒の平均電流である。

【0039】

$\alpha(C_0, \gamma)$ は次式を用いて導いた。

$$\alpha(C_0, \gamma) = YSI \text{ 濃度} / (C_0 - 2.2 \text{ mg/dL})$$

式中、 YSI はイエロー・スプリングス・インスツルメント社 (Yellow Springs Instrument) のグルコース分析器モデル23A (米国特許第5,968,760号公報明細書に記載、この内容は参考のために本明細書において引用される) を用いて測定された濃度である。

【0040】

広範なグルコース値およびヘマトクリット値について決定した C_0 、 γ および $\alpha(C_0, \gamma)$ の3次元グラフを作成し、これを図1に示す。このグラフについて簡単な式の適合を行って面を定義した。適合化されたデータの残余をモニター

してモデル式の質を確認した。次の経験式が見出された。

$$\text{ヘマトクリット補正係数} = 1 / \left((0.6637) + \left((4.9466 * \ln(C_0)) \right) / C_0 \right) + (-0.4012 * \ln(\gamma))$$

上記補正係数は $\gamma > 0.7$ および $C_0 > 40 \text{ mg/dL}$ の場合に有効である。

【0041】

I V. ヘマトクリット補正值の Y S I 決定値との比較

いくつかのグルコース・ストリップを広範なグルコース値およびヘマトクリット値を用いて試験することにより予測データ・セットを生成した。このデータから C_0 、 γ および $\alpha(C_0, \gamma)$ の項に適合するモデルを用いてヘマトクリット補正式を導いた。上記予測データ・セットにこのヘマトクリット補正式を用いると大多数のデータが $\pm 1.5\%$ 以内に入ることが見出された。また、グルコースの偏りは 4.2% ヘマトクリットであり、このデータ・セットに対するヘマトクリットの効果は最小限であることを示している。このアルゴリズムを確認するために、グルコース・センサーのもう一つのバッチを異なる血液ドナーで試験したところ、このアルゴリズムは先の発見と同様のヘマトクリット効果について正確であることが見出された。

【0042】

産業上の利用分野

上記の結果および考察から本発明によりヘマトクリットに由来する誤差が完全ではないとしても実質的に取り除かれた検体濃度を得るための簡単で強力なツールが提供されることが実証された。本発明の方法は時間-電流過渡の測定のみに依存しているので、本発明の方法は比較的簡単な電気化学的装置を用いて実施することができる。さらに、小体積しか使用する必要がなく、検定時間が比較的速い。従って、本発明は当技術に顕著に貢献している。

【0043】

本明細書において引用された刊行物および特許文献はすべて、それらが具体的にかつ個別に参考のために導入されると示されているのと同様に参考のために本明細書に導入される。任意の刊行物の引用は本出願の出願日前に開示されていることについてであり、本発明が先発明によりそのような刊行物より先行している

という資格を有していないことを自認するものではない。

【0044】

本発明の明瞭な理解のために図示および実施例により詳細に説明したが、当業者には本発明の教示に徴すれば特許請求の範囲に記載された本発明の範囲内で種々の変更および改変を加えることができることは明らかである。

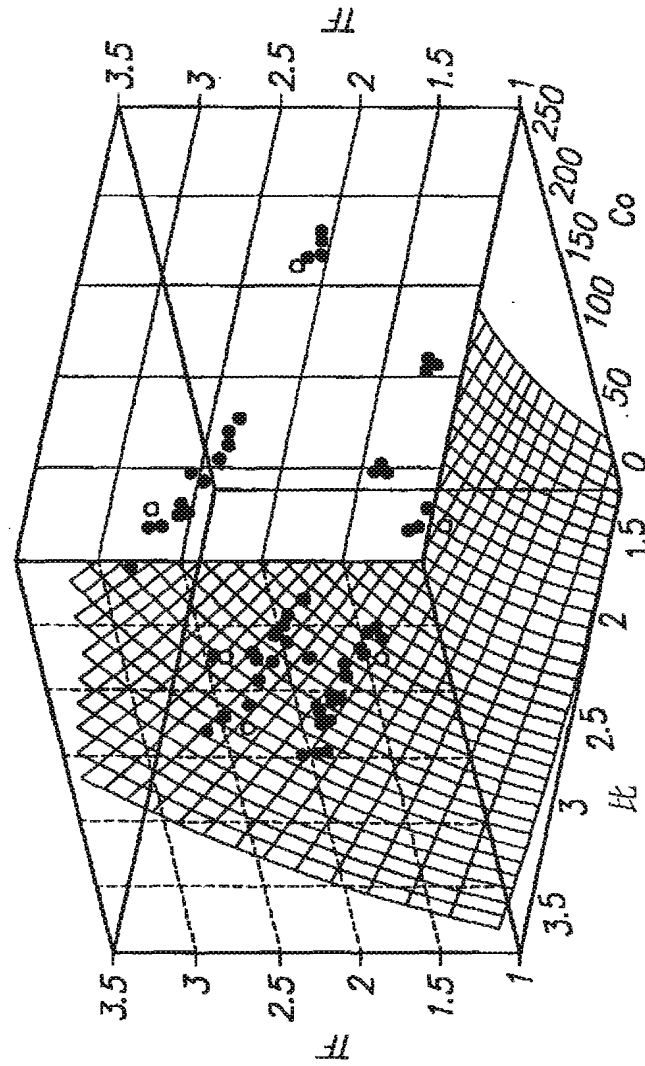
【図面の簡単な説明】

【図1】

広範囲のグルコースおよびヘマトクリット値を用いた実験データから導かれた C_0 、 γ および α (C_0 、 γ) の3次元グラフである。

【図1】

ランク1式 $302462004 \ z^{(-1)} = a + b \ln x / x + c \ln y$
 $r^2 + 0.9413853 \ DF \ Adj \ r^2 = 0.94022843 \ 適合化標準誤差 = 0.14473465 \ Fstat = 1228.6334$
 $a = 0.66370122 \ b = 4.9465908$
 $c = 0.40124333$



【手続補正書】

【提出日】平成14年10月30日(2002. 10. 30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理学的サンプル中の検体のヘマトクリット補正濃度を決定する方法であって、

(a) 前記生理学的サンプルを

(i) 離隔した作用電極および参照電極、および

(i i) 酵素とメジエーターとを含むレドックス試薬系

を含む電気化学セルに導入し、

(b) 前記反応セルに第1の極性を有する第1の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第1の時間—電流過渡を得、

(c) 前記反応セルに、前記第1の極性とは反対の第2の極性を有する第2の電位を印加し、セル電流を時間の関数として測定して第2の時間—電流過渡を得、

(d) 前記第1の時間および第2の時間—電流過渡から予備検体濃度を導き、かつ

(e) バックグラウンド値よりも低い前記予備検体濃度にヘマトクリット補正係数を乗じて前記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導き、

それにより前記サンプル中の前記検体のヘマトクリット補正濃度を決定する方法。

【請求項2】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度値を調整して前記予備検体濃度値のヘマトクリットに由来する成分を除去する請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記ヘマトクリット補正係数が前記予備検体濃度および前記

電気化学セルの γ の関数である請求項1または請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記生理学的サンプルが全血またはその誘導物である請求項1、請求項2または請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記検体がグルコースである請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記ヘマトクリット補正係数が

$$1 / \left((0.6637) + \left((4.9466 * \ln(C_0)) / C_0 \right) + (-0.4012 * \ln(\gamma)) \right)$$

(式中、 C_0 は前記予備濃度であり、かつ γ は前記電気化学セルの可変電流比である)

に等しい請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記第1の極性が負であり、前記第2の極性が正である請求項1乃至請求項6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項8】 請求項1乃至請求項7のいずれか1つに記載の生理学的サンプル中の検体の濃度を電流測定により測定するための計測装置であって、

(a) 前記サンプルを含む電気化学セルに第1の極性を有する第1の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第1の時間—電流過渡を得るための手段、

(b) 電気化学セルに前記第1の極性とは反対の第2の極性を有する第2の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第2の時間—電流過渡を得るための手段、

(c) 前記第1の時間および第2の時間—電流過渡から予備検体濃度値および変数 γ を決定する手段、および

(d) 予備濃度値からヘマトクリット成分を除去して前記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導く手段
を備える計測装置。

【請求項9】 前記電気化学的試験ストリップが前記計測装置内に存在する請求項8記載の計測装置。

【請求項10】 請求項1乃至請求項7のいずれか1つに記載の方法により生理学的サンプル中の検体の濃度を決定するための計測装置であって、

(a) 電気化学的試験ストリップ、および

(b) (1) 前記サンプルを含む電気化学セルに第1の極性を有する第1の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第1の時間—電流過渡を得るための手段、

(2) 電気化学セルに前記第1の極性とは反対の第2の極性を有する第2の電位を印加してセル電流を時間の関数として測定して第2の時間—電流過渡を得るための手段、

(3) 前記第1の時間および第2の時間—電流過渡から予備検体濃度値および変数 y を決定する手段、および

(4) 予備濃度値からヘマトクリット成分を除去して前記サンプル中のヘマトクリット補正検体濃度を導く手段
を備える計測装置。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/487		International Application No. PCT/US 01/02465
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 60391 A (KYOTO DAIICHI KAGAKU KK ;IKETAKI KAZUO (JP); INOUE YOICHI (JP); HA) 25 November 1999 (1999-11-25) & EP 1 081 490 A 7 March 2001 (2001-03-07) ---	1,2,5,6, 8-11,14, 16,17,20
A	US 5 942 102 A (BECK THOMAS WILLIAM ET AL) 24 August 1999 (1999-08-24) cited in the application the whole document ---	1,6,11, 16
A	EP 0 735 363 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 2 October 1996 (1996-10-02) example 4 ---	1,6,11, 16
A	EP 0 928 967 A (KYOTO DAIICHI KAGAKU KK) 14 July 1999 (1999-07-14) the whole document ---	1,6,11, 16
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 August 2001		Date of mailing of the international search report 16/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bosma, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.
PCT/US 01/02465

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 99 32881 A (BEATY TERRY ALLEN ; BURKE DAVID W (US); KUHN LANCE SCOTT (US); ROCH) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document</p>	<p>1,6,11, 16</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/02465

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9960391 A	25-11-1999	AU 3849799 A	06-12-1999
		EP 1081490 A	07-03-2001
US 5942102 A	24-08-1999	AU 705165 B	20-05-1999
		AU 7554996 A	05-06-1997
		BR 9611513 A	14-09-1999
		EP 0882226 A	09-12-1998
		IL 124494 A	31-08-2000
		JP 2000500571 T	18-01-2000
		US 6174420 B	16-01-2001
		AU 705313 B	20-05-1999
		AU 7555096 A	05-06-1997
		WO 9718465 A	22-05-1997
		WO 9718464 A	22-05-1997
		BR 9611514 A	14-09-1999
		CN 1254840 A	31-05-2000
		EP 0923722 A	23-06-1999
		EP 0967480 A	29-12-1999
		JP 2000500572 T	18-01-2000
		US 6179979 B	30-01-2001
EP 0735363 A	02-10-1996	DE 69221808 D	02-10-1997
		DE 69221808 T	02-04-1998
		EP 0537761 A	21-04-1993
		JP 2960265 B	06-10-1999
		JP 5340915 A	24-12-1993
		US 5264103 A	23-11-1993
		JP 2658769 B	30-09-1997
		JP 5196596 A	06-08-1993
EP 0928967 A	14-07-1999	JP 11194108 A	21-07-1999
WO 9932881 A	01-07-1999	AU 2089299 A	12-07-1999
		BR 9814386 A	10-10-2000
		CN 1303478 T	11-07-2001
		EP 1042667 A	11-10-2000
		NO 20003228 A	21-06-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
		G O 1 N 27/46	3 3 8
		27/30	3 5 3 T
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	オハラ・ティモシー・ジェイ アメリカ合衆国、94583 カリフォルニア 州、サン・ラモン、セレイヤ・サークル 2652		
(72)発明者	カーマニ・マハイヤー・ゼット アメリカ合衆国、94588 カリフォルニア 州、プレザントン、ガルフストリーム・ス トリート 3154		
F ターム(参考)	2G045 AA13 AA25 CA25 CA26 DA31 FB01 FB05 GC20 JA02		